

Identifikasi *Coxiella burnetii* Menggunakan Pengujian *Polymerase Chain Reaction* pada Kambing Di Kota Kupang

(Identification of Coxiella Brunetii Using Polymerase Chain Reaction Method in Goats In Kupang)

Annytha Detha

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana
Jl. Adi Sucipto, Kampus Baru Undana, Penfui. Kupang-Nusa Tenggara Timur.
Telepon: (+62)81383305264. E-mail: *annytha.detha@gmail.com*

ABSTRACT

Identification of *Coxiella burnetii* using polymerase chain reaction method in goats in Kupang area at Nusa Tenggara Timur had been done. *Coxiella burnetii* as causative of Q fever zoonosis in human and livestock and become public health problem. Q fever is considered an occupation hazard and caused epidemics in abattoir, scientific worker and livestock worker. This analysis using first Polymerase Chain Reaction and Nested Polymerase Chain Reaction as sets of primer to detect *C. burnetii*. There are 40 sampel as the material to detect agent Q fever. The sample derived from one of the residential houses in Kupang. First and Nested PCR result to identification of *Coxiella burnetii* using PCR method showed that 40 samples did not contain the material genetic of *C. burnetii* in goats in Kupang Nusa Tenggara Timur.

Key word: *Coxiella burnetii*, PCR, Q fever.

PENDAHULUAN

Coxiella burnetii adalah agen penyebab *Q fever* pada manusia dan *coxiellosis* pada hewan. *Coxiella burnetii* yang menyebabkan Penyakit *Q fever* memiliki rsifat obligat intraseluler, berbentuk batang (*coccobacillus*) dengan ukuran 0,3-1,0 µm, pleomorfik dan bergram negatif. *C. burnetii* bersifat obligat intraseluler pada inangnya dan memiliki karakter yang mirip dengan *Rickettsia* (Ogawa *et al.* 2004). *C. burnetii* sulit dilihat dengan teknik pewarnaan gram walaupun memiliki membran yang sama seperti bakteri gram negatif lainnya.

C. burnetii bersifat sangat kontagius dan dapat bertahan dalam lingkungan dalam kurun waktu lama, tahan pada pH rendah dan tahan terhadap beberapa bahan

kimia pembasmi bakteri seperti lisol, sodium hipoklorit dan radiasi sinar UV (Maurin dan Raoult 1999). *C. burnetii* memiliki formasi spora yang menyebabkan bakteri ini bersifat patogen. Spora ini dapat bertahan 7-10 bulan pada dinding pada suhu 15-20 °C, lebih dari satu bulan pada daging dalam penyimpanan dingin dan lebih dari 40 bulan pada susu skim pada suhu ruangan (Marrie 2003).

Penyakit *Q fever* adalah penyakit zoonosis. Beberapa jenis hewan yang dapat terserang penyakit *Q fever* antara lain sapi, kambing, domba, ruminansia lain, unggas, hewan peliharaan seperti anjing dan kucing, serta hewan liar.

Rodensia, caplak dan serangga bahkan ikan juga merupakan sumber penularan penting bagi penyakit *Q fever* (Marrie 2003). Pada manusia *Q fever* menyebabkan gangguan pada tubuh seperti malaise, myalgia, sakit kepala, kedinginan, kelelahan, dan demam tinggi bahkan sering dihubungkan dengan penyakit pernafasan (Acha dan Szyfres 2003). *Q fever* dapat bersifat akut, sering muncul seperti pneumonia dan hepatitis (Fournier dan Raoult 2003) dan infeksi kronis seperti endokarditis dan osteomielitis. Penelitian terbaru menunjukkan gangguan pada pembuluh darah aorta didiagnosa akibat agen *C. burnetii* (Panau *et al.* 2007). Ketika infeksi terjadi pada wanita hamil dapat menyebabkan keguguran, kelahiran prematur, kelahiran dengan berat kurang dari normal, radang plasenta dan infeksi uterus kronis (Raoult 2002).

Penularan *Q fever* terjadi secara langsung dan tidak langsung dari hewan yang terinfeksi (Raoult 2002). Penularan *Q fever* dapat terjadi melalui kontak langsung, partikel debu, bahan makanan asal hewan, luka yang terkontami, cairan amnion, plasenta, selaput lendir, tinja dan urin dari hewan yang terinfeksi *C. burnetii* (Acha dan Szyfres 2003).

Penyebaran penyakit *Q fever* telah meluas hampir diseluruh dunia bahkan telah menjadi masalah kesehatan masyarakat di banyak negara seperti Amerika, Perancis, Inggris, Italia, Jerman, Spanyol, Kanada, Jepang, Australia, Thailand, Taiwan, Malaysia dan beberapa negara lain di Asia Tenggara (Fournier *et al.* 1998). Mahatmi (2006) menemukan bahwa *Coxiella burnetii* positif ditemukan pada sapi bali di Provinsi Bali. Hasil

penelitian ini menunjukkan potensi penyebaran penyakit ini yang meluas di Wilayah Indoensia lainnya. Salah satu daerah yang merupakan sumber produksi ternak di Indonesia, adalah Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT).

Selain sapi timor, ternak kambing juga menjadi salah satu ternak unggulan yang berpotensi di wilayah Nusa Tenggara Timur. Namun demikian, hingga saat ini belum pernah dilakukan penelitian yang tentang penyakit *Q fever* pada kambing di Wilayah Nusa Tenggara Timur. Penelitian tentang identifikasi *Coxiella burnetii* menggunakan pengujian PCR pada kambing di kota kupang diharapkan dapat memberikan manfaat berupa informasi dasar bagi pengembangan sistem pengawasan terhadap lalu lintas ternak khususnya kambing untuk pencegahan dan pengendalian *Coxiella burnetii*.

MATERI DAN METODE

Pengambilan Sampel di Lapangan

Dalam pengambilan sampel difokuskan pada tempat pemotongan kambing di rumah salah satu penduduk yang secara rutin menyembelih kambing setiap hari, yaitu Bapak M. Said Ibrahim, Jl. Waingapu No.9, Pasir Panjang, Kota Kupang. Pada wilayah Kota Kupang tersedia rumah potong hewan (RPH) untuk ternak kambing namun belum dimaksimalkan sehingga sampel hanya diperoleh dari warga yang setiap hari rutin memotong ternak kambing. Rata-rata pemotongan kambing yang dipotong berkisar 1-4 ekor per hari. Pengambilan sampel dilakukan setiap hari selama 2 minggu, dikarenakan jumlah pemotongan yang tidak menentu. Selama periode 2 minggu, diperoleh sebanyak 40 sampel.

Pengambilan sampel, yang berupa organ hati dan jantung, dilaksanakan pada pagi hari dan ditransportasikan menggunakan *coolbox* ketempat penyimpanan sampel dan disimpan dalam *freezer* untuk menghindari kerusakan. Setelah semua sampel terkumpul, selanjutnya sampel dikeluarkan dan disimpan dalam *coolbox* untuk ditranspotasikan ke laboratorium.

Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Penyakit Hewan, Departemen Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Bahan dan Alat Penelitian

Sampel penelitian terdiri dari hati dan jantung kambing untuk mendeteksi *C. burnetii* pada jaringan padat seperti jantung dan hati seperti yang dilakukan Mahatmi (2006). Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA: *cell lysis solution*, *proteinase K solution*, *RNase A solution*, *protein precipitation solution*, 100% isopropanol (2- propanol), 70% Etanol, *DNA hydration solution*. Bahan primer yang digunakan pada first PCR adalah OMP 1(5'-AGT AGA AGC ATC CCA AGC ATT-G), OMP2 (TGC CTG CTA GCT GTA ACG ATT-G), 10 x *taq buffer*, dNTP, akuabidestilata bebas DNA, *taq polymerase*, DNA sampel, kontrol positif *C. burnetii* strain Nine Mile II (ATCC) sedangkan bahan primer pada Nested PCR adalah OMP3 (5'-GAA GCG CAA GAA GAA CAC-3'), OMP4 (5-TTG GAA GTT ATC ACG CAG TTG-3').

Primer Nested PCR dirancang dari susunan membran luar *C. burnetii* dengan berat 29 kDa yang merupakan bagian *converse region C. burnetii* dengan

produk amplifikasi 437 bp. Pengujian ini sebagaimana yang dilakukan oleh Zhang *et al.* (1998) dan Ogawa *et al.* (2004), selebihnya menggunakan bahan yang sama seperti first PCR.

Bahan untuk mendeteksi hasil amplifikasi menggunakan agar agarose (sigma), Larutan 1 x tris acetate EDTA dan *bromo phenol blue*. Alat yang digunakan antara lain *cleanbench*, timbangan mikro, mikropipet, *ependorf* steril, *microtube* PCR, PCR (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600), elektroforesis, vortex, sentrifus, *microwave*, UV luminator, *erlenmeyer*.

Identifikasi DNA *C. burnetii* dengan metode PCR

Penggunaan metode *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi keberadaan *C. burnetii* pada serum dan sel leukosit adalah metode yang memiliki nilai akurasi yang tinggi dan telah banyak digunakan untuk mendiagnosa *Q fever*. Dari penelitian Ogawa *et al.* (2004), telah dievaluasi bahwa untuk mendeteksi *C. burnetii* dengan menggunakan metode nested PCR memiliki tingkat sensitivitas 10 kali lebih baik dibanding metode PCR *assay*. Metode PCR yang diterapkan pada penelitian ini berdasarkan standar yang dipakai pada *National Institut of Infectious Disease* (NIID) Jepang (Setiyono *et al.* 2005).

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan memakai standar DNA *purification* kit. Setiap sampel (gabungan organ hati dan jantung) diambil kira-kira 50 mg dihaluskan dan dimasukkan ke dalam tabung mikro. Tambahkan *cell lysis solution* (*puregene*), dihomogenisasi sampai terbentuk suspensi. Proses selanjutnya penambahan 1,5 µl *proteinase*

K solution dan diinkubasikan pada suhu 65 °C selama 1 jam, tambahkan *precipitation solution* (puregene) 100 µl, dan di-vortex. Sentrifus dengan kecepatan 15 000 xg selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan hasil sentrifus diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru dan ditambahkan 300 µl isopropanol, di-vortex 20 kali. Setelah itu sampel lalu disentrifus dengan kecepatan 15 000 x G selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang, filtrat yang tersisa di dasar tabung merupakan pelet DNA, tambahkan etanol 70% sebanyak 500 µl, untuk proses pencucian. Disentrifus 15 000 xg selama 5 menit pada suhu 5 °C. Supernatan dibuang secara hati-hati, penguapan alkohol yang tersisa dilakukan dalam *cleanbench* selama 1 jam. Tambahkan DNA *dehydration solution*, diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65 °C. DNA yang diperoleh disimpan pada suhu 4 °C dan siap untuk preparasi PCR.

First PCR

First PCR dilakukan memakai primer yang dirancang berdasarkan sekuen spesifik dari membran luar *C. burnetii* dengan berat molekul 29 kDa. Pekerjaan dilakukan di dalam *cleanbench* yang sebelumnya sudah disterilisasi (dengan alkohol 70% dan UV selama 15 menit). Pada saat *cleanbench* akan digunakan disterilisasi lagi dengan DNA *away* untuk merusak DNA kontaminasi yang mungkin ada. PCR *mixture* diawali dengan menyiapkan tabung mikro volume 1,5 ml untuk PCR *mixture* yang terdiri dari primer, dNTP, taq *buffer*, akuabidestilata dan terakhir adalah taq *polymerase* sebanyak volume diatas dikalikan jumlah sampel yang diperiksa, dicampur menggunakan pipet mikro dan dipindahkan ke dalam tabung PCR yang telah diberi nomor sampel, masing-masing sebanyak 27 µl. Untuk menghindari

kontaminasi dan terlalu lama pada suhu ruang, maka bahan-bahan seperti primer, taq *polymerase*, dNTP segera disimpan kembali ke dalam *freezer* -84 °C.

Ekstraksi DNA sampel disiapkan. Setiap tabung PCR yang telah ditandai dan berisi PCR *mixture* masing-masing ditambahkan 3 µl ekstraksi DNA sampel. Setiap penambahan DNA sampel diusahakan mencampur dengan sempurna dengan menggunakan pipet mikro. Setelah semua sampel DNA dimasukkan dalam setiap tabung PCR, sisa sampel DNA disimpan kembali ke dalam *medicool*. Selanjutnya kontrol positif *C. burnetii* NM-2 pada 437 bp ditambahkan ke dalam tabung PCR yang telah berisi 27 µl *mixture* PCR sebanyak 3 µl, sehingga semua tabung PCR masing-masing berisi 30 µl. Kemudian diatur dalam mesin *thermal cycler* (Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 9600).

Amplifikasi diatur dengan program 35 *cycles*, yang terdiri dari proses denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 54 °C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 2 menit dan diakhiri dengan proses pendinginan 4 °C. Produk amplifikasi berjalan kira-kira 3 jam. Setelah proses amplifikasi selesai, tabung PCR dikeluarkan dari mesin PCR dan siap untuk dilakukan elektroforesis dan nested PCR.

Deteksi Hasil Amplifikasi

Setelah proses amplifikasi pada mesin PCR selesai, dilakukan elektroforesis. Persiapan sebelum elektroforesis adalah pembuatan gel agarose dengan cetakan 25 sumuran menggunakan bahan agar dari agar agarose (sigma) 1.5% dalam larutan 1 X tris acetat EDTA. Selanjutnya larutan 1 x tris acetat EDTA sebanyak 350 ml

dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis yang telah diisi atau sampai batas yang tertera pada alat dengan tegangan 100 volt dan frekuensi 50 Hz selama 30 menit. Proses selanjutnya adalah mencampurkan setiap sampel hasil first PCR dengan *bromo phenol blue* sebanyak 5 µl diatas plastik steril.

Kotak pertama yang berisi *bromo phenol blue* 5 µl ditambahkan 2 µl penanda DNA (100-1200 bp) disuspensikan dengan sempurna menggunakan mikro pipet dan diambil 7 µl dengan hati-hati dimasukan ke dalam sumuran pada gel yang sudah dimasukan dalam tangki mesin elektroforesis. Kotak kedua dan seterusnya yang berisi *bromo phenol blue* ditambahkan 2 µl masing-masing sampel hasil amplifikasi first PCR. Kemudian dicampur dengan mikropipet dan dimasukan secara hati-hati ke dalam sumuran pada gel yang ada di dalam tangki mesin elektroforesis, hal yang sama dilakukan terhadap penanda DNA, kontrol positif dan beberapa sumuran untuk hasil sampel hasil amplifikasi first PCR.

Molekul DNA akan bergerak dari kutub negatif ke positif, molekul DNA dibiarkan berjalan sampai batas 3 garis dari bawah, kemudian mesin dimatikan. Proses elektroforesis berlangsung ±30 menit. Gel hasil elektroforesis diangkat dari dalam tangki mesin elektroforesis dan dibilas dengan akuades serta kemudian dimasukan dalam larutan pewarna ethidium bromida (60 ug/ml) selama 20 menit kemudian dilihat dibawah sinar UV dan difoto.

Nested PCR

Primer yang dipakai untuk nested PCR dirancang dari susunan meml 107
luar *C. burnetii* dengan berat 29 k
yang merupakan bagian *conserve region*
C. burnetii dengan produk amplifikasi
437

bp. PCR *mixture* diawali dengan menyiapkan tabung mikro volume 1,5 ml untuk PCR *mixture* yang terdiri dari primer, dNTP, taq *buffer*, akuabidestilata dan taq *polymerase* sebanyak volume diatas dikalikan jumlah sampel yang diperiksa.

Amplifikasi diatur dengan program 35 *cycles*, yang diawali dengan pemanasan suhu 94 °C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 56 °C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik, ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 4 menit dan diakhiri dengan proses pendinginan 4 °C. Produk amplifikasi berjalan kira-kira selama 3 jam 30 menit. Setelah proses amplifikasi selesai, tabung PCR dikeluarkan dari mesin PCR dan siap untuk dilakukan elektroforesis.

Tujuan penggunaan PCR adalah untuk memperbanyak jumlah DNA yang hanya sedikit yang biasanya berasal dari potongan jaringan atau darah. Pada prinsipnya utas ganda DNA cetakan dipisah dengan cara pemanasan yang disebut denaturasi. Hal ini menyebabkan enzim polimerasi terus bekerja memperpanjang primer dan mensintesa sepanjang untai DNA target. Pada akhir siklus diperoleh jumlah DNA dua kali lebih banyak dari sebelumnya. Hasil amplifikasi dapat dilihat dengan elektroforesis dari untai DNA yang diwarnai dengan ethidium bromida dan dideteksi pada luminator UV.

Nested polymerase chain reaction adalah modifikasi atau variasi dari PCR untuk mengurangi kontaminasi dalam produk amplifikasi primer yang tidak diharapkan. PCR adalah proses digunakan

untuk amplifikasi DNA contoh melalui temperatur DNA polimerase. Nested PCR meliputi dua set primer dan menggunakan dua kali *run* dari PCR. Pada first PCR amplifikasi primer fragmen yang sama untuk standar PCR. Primer yang kedua mengikat fragmen produk first PCR untuk mendapatkan amplifikasi primer baru (kedua) yang lebih pendek dan lebih kecil dari yang pertama dari fragmen DNA sehingga nested PCR sangat spesifik untuk amplifikasi PCR dan sedikit kontaminasi (Bergallo *et al.* 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian First PCR

Pengujian dengan first PCR menggunakan OMP 1 dan OMP 2. Pada first PCR yang dielektroforesis dan diwarnai dengan ethyidium bromida serta diamati dengan uv iluminator. Dalam first PCR terdapat empat tahap suhu sebagai prinsip kerja yaitu komplementasi antar DNA. Reaksi komplementasi tersebut adalah denaturasi, penempelan primer (*annealing*), perpanjangan rantai oleh DNA polimerase (*extension*) dan pendinginan.

Hasil first PCR, yang telah dilakukan kemudian dielektroforesis dan diamati pada uv iluminator, menunjukkan hasil negatif. Hal ini diindikasikan dengan ketidakhadiran pita yang menunjukkan pita spesifik *C. burnetii* strain Nine Mile II yang digunakan sebagai referensi.

Pengujian Nested PCR

Pengujian selanjutnya adalah nested PCR yang menggunakan OMP 3 dan OMP 4 kemudian dilanjutkan proses elektroforesis dan diwarnai dengan ethyidium bromida serta diamati

dengan uv iluminator. Nested PCR diperlukan sebab sesuai dengan penelitian Ogawa (2004), menunjukkan bahwa Nested PCR memiliki tingkat sensitifitas 10 kali lebih tinggi dibanding first PCR. Pita kontrol *C. burnetii* memberikan gambaran pita yang lebih spesifik dibanding pada First PCR, hal ini menunjukkan bahwa nested PCR lebih sensitif dibanding First PCR.

Dalam nested PCR terdapat empat tahap suhu sebagai prinsip kerja seperti pada first PCR yaitu komplementasi antar DNA namun yang membedakan adalah waktu yang diperlukan untuk nested PCR adalah lebih lama. Reaksi komplementasi tersebut adalah denaturasi, penempelan primer (*annealing*), perpanjangan rantai oleh DNA polimerase (*extension*) dan pendinginan. Contoh organ kambing yang diuji memperlihatkan tidak ada pita spesifik sesuai dengan kontrol positif dari *C. burnetii* strain Nine Mile II. Hasil uji nested PCR dari 40 sampel campuran hati dan jantung kambing menunjukkan hasil negatif.

Pada ekstraksi DNA sampel yang diambil adalah organ hati dan jantung kambing. Dalam fase akut, *C. burnetii* bisa ditemukan dalam darah (Maurin 1999). Namun pada fase kronis agen penyakit ini banyak terakumulasi dalam sel fagosit yang terdapat pada organ-organ seperti jantung, hati, limpa dan plasenta (Marrie 2003). Telah diketahui memiliki tempat predileksi di dalam sel fagosit organ hati dan jantung.

Berdasarkan data yang ada pada tahun 2006 terdapat 496 766 ekor ternak kambing yang didata oleh Dinas Peternakan Nusa Tenggara Timur (DISNAK NTT 2007). Populasi ternak kambing setiap tahunnya relatif meningkat, dari tahun 2010 hingga 2013

secara berurutan yaitu 579 376, 559 755, 578 829, dan 577 220 (Deptan 2014). Dengan data ternak kambing yang ada di NTT menunjukkan bahwa penduduk NTT memiliki peluang yang lebih besar beresiko terkena penyakit zoonosis.

Menurut Marrie 2003, beberapa obat-obatan yang sering diberikan baik dengan pemberian sendiri maupun dikombinasi dalam pengobatan *Q fever* adalah tetracycline, doxycycline, eritromycin, fluorocloroquin, rifampin, azitromycin. Antibiotik lain yang juga mampu membunuh agen *C. burnetii* adalah sulfametoksazol, trimetoprim, kloramfenikol, kotrimoksazol, quinolon (Rault 2002). Jenis obat yang disebutkan diatas mengandung zat aktif yang dapat menghambat *C. burnetii*.

Pencegahan *Q fever* dengan vaksinasi dianjurkan diberikan pada individu yang mempunyai resiko tinggi tertular *Q fever* seperti peternak, dokter hewan, pekerja rumah potong, dan para mendis. Berbagai jenis vaksin telah dicoba, di Rusia telah dikembangkan jenis vaksin dari *C. burnetii* yang dilemahkan dan di Australia telah dikembangkan vaksin formalin inaktif yang disebut *Q-Vak* yang telah dibuktikan 100% efektif selama periode 5 tahun terakhir (Page 2004). Mengingat keberadaan *Q Fever* di Indonesia, maka perlu dipertimbangkan tindakan pencegahan yang efektif.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil Identifikasi *Coxiella burnetii* menggunakan penguji PCR pada kambing di Kota Kupang ma tidak ditemukan keberadaan material genetik *C. burnetii* pada 40 sampel ternak kambing yang dipotong di Kota Kupang NTT. Perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam tentang Identifikasi *Coxiella burnetii* di NTT

melalui pengambilan sampel yang lebih merata di seluruh daerah peternakan yang ada di NTT (hal ini perlu untuk mendiagnosa keberadaan *Q fever* sedini mungkin).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dr. drh. Agus Setyono, MS, yang telah memberikan semua bahan yang diperlukan. Ucapan terima kasih kedua kepada Bapak, M.Said Ibramim, yang telah membantu dalam penyediaan sampel

DAFTAR PUSTAKA

- Acha PN, Szyfres B. 2003. *Zoonosis and Communicable Disease Common to Man and Animals*. Ed ke-3. Washington: World Health Organization.
- [DISNAK NTT] Dinas Peternakan Nusa Tenggara Timur. 2007. *Statistik Peternakan NTT 2006*. DISNAK NTT.
- [Deptan RI] Departemen Pertanian Republik Indonesia. 2014. *Populasi dan Produksi Peternakan di Indonesia*. Deptan RI.
- Fournier PE, Raoult D. 2003. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute *Q fever*. *J Clin Microbiol* 41:5094-5098.
- Fournier PE, Thomas JM, Raoult D. 1998. Diagnosis of *Q fever*. *J Clin Microbiol* 36:1823-1834.
- atmi H. 2006. Studi *Q fever* pada ruminansia di wilayah Bogor dan Provinsi Bali [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

- Marrie TJ. 2003. *Coxiella burnetii* pneumonia. *Eur Respir Journal* 21(4): 713-719.
- Maurin M, Raoult D. 1999. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12:518-553.
- Ogawa M *et al.* 2004. Evaluation of PCR and nested PCR assays currently used for *C. burnetii* in Japan. *J Trop Med* 35:151-154.
- Page W. 2004. *Health Effects Of Project Shipboard Hazard and Defense Biological Agent Coxiella burnetii*. Brookville. SHAD press.
- Panau F *et al.* 2007. Infective Aortic Valve Endocarditis from *Coxiella burnetii*. *Hellenic J Cardiol* 48: 177-180.
- Raoult D, Fenollar F, Stein A. 2002. **Q Fever During Pregnancy**. *Arch Intern Med* 162:701-704.
- Raoult D. 2002. Q fever: still a mysterious disease. *Q J Med* 95:491.
- Setiyono A *et al.* 2005. New criteria of immunofluorescence assay for Q fever diagnosis in Japan. *J Clin Microbiol* 43:5555-5559.
- Zhang GQ *et al.* 1998. Clinical evaluation of new PCR assay for detection of *C. burnetii* in human sample. *J Clin Microbiol* 36:77-80.